



## AUSLEGESCHRIFT 1 152 396

V 17942 IVb/12o

ANMELDETAG: 26. JANUAR 1960

BEKANNTMACHUNG

DER ANMELDUNG

UND AUSGABE DER

AUSLEGESCHRIFT: 8. AUGUST 1963

## 1

Die Erfindung hat die Herstellung von Schwefelsäureestern der Carboxyalkylcarbonsäuredextrane, wie Carboxymethyl-, Carboxyäthyl- und Carboxypropyldextran zum Ziel, die bei einem beträchtlich niedrigerem Schwefelgehalt als analoge Schwefelsäureester 5 starke heparinoide Wirkung aufweisen.

Es ist bekannt, daß Polysaccharid-Polyschwefelsäureester blutgerinnungshemmende Wirkung besitzen (z. B. deutsche Patentschriften 954 592 und 970 763). Es ist ferner bekannt, daß die meisten dieser Stoffe 10 so toxisch sind, daß sie therapeutisch nicht verwendet werden können (Karrer et. al. Helv. Chim. Acta 27 (1944), S. 1422 ff.).

Nach Winterstein (A. Winterstein, Thromb. Diath. haem. Vol. 2, Nr. 5/6 [1958], S. 428 ff.) ist ein Polysaccharid-Polyschwefelsäureester um so wirksamer, je höher sein Molekulargewicht (Kohlenhydratkette) und je höher sein Schwefelgehalt ist. Die Toxi- 15 zität erhöht sich bei synthetischen Präparaten analog: Je höher das Molekulargewicht und je höher der Schwefelgehalt, desto toxischer das Präparat. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die Toxizität durch Einhalten eines bestimmten, relativ niedrigen Molekulargewichtsbereiches zu verringern. Derartige Ver- 20 fahren sind z. B. Gegenstand der deutschen Patentschriften 954 592 und 970 763, wodurch bestimmte methodische Maßnahmen ein Molekulargewicht des Dextransulfats von vorzugsweise 7500 erreicht wird.

An der Cellulose wurde gefunden, daß die Toxi- 25 zität ihrer Schwefelsäureester durch Einführung von Carboxymethylgruppen und  $\beta$ -Oxyäthylgruppen vermindert werden kann (schweizerische Patentschrift 235 956).

Allen diesen Verfahren gemeinsam ist die Tendenz, 30 die heparinoide Wirksamkeit durch Einhalten eines optimalen Schwefelgehaltes zu gewährleisten und die damit verbundene Toxizität durch andere Maßnahmen, nämlich Senkung des Molekulargewichtes oder Einführung von Carboxymethyl- bzw.  $\beta$ -Oxyäthylgruppen zu verringern.

Die wenn auch geringe Hemmwirkung neutraler Polysaccharide auf die Gerinnung und ihre mögliche Verstärkung durch andere saure Gruppen als  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen fand bisher in dem hier interessierenden Zusammenhang noch keine Beachtung. Aus der An- 35 wendungspraxis von klinischem Dextran, besonders bei postoperativen Indikationen, ist bekanntgeworden, daß die Blutungszeit auffallenderweise verlängert wird (U. Jacobäus, Acta med. Scand. Suppl. 322 [1957], S. 93). Die Erscheinung ist für Dextran-Infusionslösungen charakteristisch.

Bei der Überprüfung dieses Phänomens wurde

Verfahren zur Herstellung  
von Natriumsalzen blutgerinnungshemmender  
Dextranschwefelsäureester

Anmelder:

VEB Serum-Werk Bernburg,  
Bernburg/Saale, Hallesche Landstr. 105b

Dr. Ulrich Behrens, Dr. Manfred Ringpfeil  
und Anton Gabert, Leipzig,  
sind als Erfinder genannt worden

## 2

überraschenderweise gefunden, daß es durch Ein- 30 führung von Carboxyalkylgruppen in das Dextranmolekül erhöht wird.

Bei der Kombination dieses Effektes mit der an sich bekannten blutgerinnungshemmenden Wirkung von Dextransulfaten wurde festgestellt, daß erfindungs- 35 gemäß hergestellte Carboxyalkyldextran-Polyschwefelsäureester mit einem wesentlich niedrigeren Schwefelgehalt als analog hergestellte Dextranpolyschwefelsäureester eine gleichwertig starke heparinoide Wirksamkeit ausüben.

Dadurch wird ein nicht bekannter Weg zur Her- 40 stellung von Polysaccharid-Polyschwefelsäureestern mit heparinoider Wirkung beschritten. Im spezifischen Falle des Dextrans läßt sich die schwefelenthaltende Komponente, die  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppe wesentlich verringern und somit die ihr zugeschriebene toxische Wirkung. Der damit verbundene Verlust an gerinnungshem- 45 mender Wirksamkeit läßt sich durch Einführung von sauren Gruppen, wie Carboxymethyl-, Carboxyäthyl- und Carboxypropylgruppen ausgleichen.

In der Abbildung sind Ergebnisse dieser Substitu- 50 tion von  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen durch saure Gruppen hinsichtlich der Recalsifizierungszeit am Humanplasma dargestellt. Es handelt sich bei diesem Vergleich um zwei Gruppen von Derivaten. Die beiden Gruppen werden jeweils aus den gleichen Ausgangsmaterialien (Dextran) hergestellt. Bei der ersten Gruppe wurde höhermolekulares Dextran (mittleres Molekular-

309 650/264

gewicht 75 000), bei der zweiten Gruppe niedermolekulares Dextran (mittleres Molekulargewicht 30 000) verwendet. Es geht aus den Kurven klar hervor, daß der Verlust an Schwefel durch die Einführung der sauren Carboxymethylgruppen kompensiert bzw. überkompensiert wird. Bei der ersten Gruppe enthält das Carboxymethyldextransulfat 34,9 % Schwefel weniger als das entsprechende Dextransulfat; bei der zweiten Gruppe enthält das Carboxymethyldextransulfat 33,7 % Schwefel weniger als das entsprechende Dextransulfat. Der Substitutionsgrad  $\beta$  (für COOH-Gruppen) liegt beim ersten Carboxymethyldextransulfat bei 0,471, beim zweiten Carboxymethyldextransulfat bei 0,503. Analoge Ergebnisse wurden bei der Messung der Thrombinzeit gefunden. Alle diese Produkte erwiesen sich als nicht toxisch. Der Schwefelgehalt der erfindungsgemäß hergestellten Präparate liegt mindestens um ein Drittel niedriger als der der bekannten wirksamen Präparate.

Es gibt zwei Wege zur Herstellung der Verfahrensprodukte. Man kann die Carboxyalkylierung des Dextrans durchführen und anschließend sulfurieren; es kann aber auch der umgekehrte Weg beschritten werden, d. h., daß man erst die Sulfurierung und dann die Carboxymethylierung durchführt.

### Beispiel 1

#### Herstellung von Carboxymethyldextransulfat-Natrium

a) 200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 75 000) wird mit 630 ml destilliertem Wasser angerührt. Dann werden 630 ml 40%ige Natronlauge zugesetzt und so lange gerührt, bis sich das Dextran vollständig gelöst hat. Danach werden unter Rühren portionsweise 300 g Monochloressigsäure eingetragen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches darf dabei nicht über 20° C ansteigen. Man läßt den Ansatz über Nacht stehen und fällt dann mit Methanol das Carboxymethyldextran-Natrium aus. Das Produkt wird durch mehrfaches Umfällen gereinigt. Man erhält 255 g des Natriumsalzes mit einem Substitutionsgrad von 0,471.

b) Zu 800 ml absolutem Pyridin werden unter Rührung und Kühlung mit Methanol-Kohlensäure 180 ml Chlorsulfonsäure getropft. Örtliche Überhitzungen, kenntlich durch Verfärbung der gebildeten Pyridiniumsalze, wurden vermieden. Nach Entfernung des Kühlbades werden die ausgeschiedenen Pyridiniumsalze durch Erwärmen auf 60 bis 70° C größtenteils in Lösung gebracht. Dann werden 120 g des getrockneten, fein pulverisierten Carboxymethyldextran-Natriums unter Rühren eingetragen. Die Temperatur wird nunmehr auf 75 bis 80° C gebracht und unter Rühren 4 Stunden beibehalten. Man läßt das Reaktionsgemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Danach wird die Reaktionsmasse in 1 l Eiswasser eingerührt. Die Pyridiniumsalze werden durch Zugabe von 40%iger Natronlauge zersetzt. Das abgeschiedene Pyridin wird abgetrennt, das Natriumsalz des Carboxymethyldextransulfats mit Methanol gefällt, mehrfach umgefällt und dann der Dialyse unterworfen. Das Dialysat wird bei 40 bis 50° C im Vakuum bis zur sirupösen Konsistenz eingedampft. Das sirupöse Produkt wird in Methanol eingerührt, unter Methanol gegebenenfalls zerkleinert, mit Aceton und Äther gewaschen und anschließend getrocknet. Ausbeute an Natriumsalz: 160 g. Der Schwefelgehalt beträgt 10,8 %, bezogen auf das Natriumsalz.

### Beispiel 2

#### Herstellung von Carboxymethyldextransulfat-Natrium

a) 200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 75 000) werden mit 630 ml destilliertem Wasser angerührt. Dann werden 630 ml 40%ige Natronlauge zugesetzt und so lange gerührt, bis sich alles Dextran gelöst hat. Danach werden portionsweise 300 g Monochloressigsäure eingetragen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches darf dabei nicht über 20° C steigen. Man läßt den Ansatz 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen und fällt dann das gebildete Carboxymethyldextran-Natrium mit Methanol aus. Das Produkt wird durch mehrfaches Umfällen gereinigt. Man erhält 360 g des Natriumsalzes mit einem Substitutionsgrad von 0,693.

b) Aus 800 ml absolutem Pyridin und 180 ml Chlorsulfonsäure wird analog Beispiel 1 das Pyridiniumsulfurierungsgemisch hergestellt. In die bei 60 bis 70° C größtenteils gelösten Pyridiniumsalze werden 120 g des obigen getrockneten und fein pulverisierten Carboxymethyldextran-Natriums eingebracht und 4 Stunden bei 75 bis 80° C sulfuriert. Die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes sowie dessen Reinigung erfolgt analog Beispiel 1. Man erhält 150 g des Natriumsalzes mit einem Schwefelgehalt von 10,4 %.

### Beispiel 3

#### Herstellung von Carboxymethyldextransulfat-Natrium

a) 200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 30 000) werden mit 630 ml destilliertem Wasser angerührt. Dann werden 630 ml 40%ige Natronlauge zugesetzt und bis zur Lösung des Dextrans gerührt. Nachdem sich alles Dextran gelöst hat, werden 300 g Monochloressigsäure portionsweise eingetragen, wobei die Temperatur des Reaktionsgemisches nicht über 20° C steigen darf. Man läßt den Ansatz über Nacht stehen, fällt das gebildete Carboxymethyldextran-Natrium mit Methanol aus und reinigt es durch mehrfaches Umfällen. Man erhält 260 g des Natriumsalzes mit einem Substitutionsgrad von 0,560.

b) Aus 800 ml absolutem Pyridin und 180 ml Chlorsulfonsäure wird analog Beispiel 1 das Pyridiniumsulfurierungsgemisch hergestellt. In die bei 60 bis 70° C größtenteils in Lösung gebrachten Pyridiniumsalze werden 120 g des obigen getrockneten und fein pulverisierten Carboxymethyldextran-Natriums eingetragen und 4 Stunden bei 75 bis 80° C sulfuriert. Die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes erfolgt analog Beispiel 1. Man erhält 130 g des Natriumsalzes mit einem Schwefelgehalt von 10,76 %.

### Beispiel 4

#### Herstellung von Carboxypropyldextransulfat-Natrium

a) 200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 13 000) werden mit 644 ml destilliertem Wasser angerührt und mit 644 ml 40%iger Natronlauge versetzt. Nachdem das Dextran unter Rühren vollständig in Lösung gebracht wurde, wurden 528 g  $\gamma$ -Brombuttersäure portionsweise eingetragen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches wurde auf unter 20° C gehalten. Man

läßt den Ansatz einen Tag stehen und fällt das gebildete Carboxymethyldextran-Natrium mit Methanol aus und reinigt es durch mehrfaches Umfällen. Ausbeute: 110 g.

b) Aus 665 ml absolutem Pyridin und 150 ml 5 Chlorsulfonsäure wurde analog Beispiel 1 das Pyridiniumsulfurierungsgemisch hergestellt. In die bei 60 bis 70° C größtenteils in Lösung gebrachten Pyridiniumsalze wurden 100 g des getrockneten und fein pulverisierten Carboxypropyldextran-Natriums einge- 10 rührt und anschließend 4 Stunden bei 75 bis 80° C sulfuriert.

Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches sowie dessen Reinigung erfolgt analog Beispiel 1. Man er-

hält 60 g des Natriumsalzes mit einem Schwefelgehalt von 11,3 %.

#### PATENTANSPRUCH:

Verfahren zur Herstellung von Natriumsalzen blutgerinnungshemmender Dextranschwefelsäureester, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Dextrane im Molekulargewichtsbereich von 10 000 bis 250 000 in bekannter Weise sowohl mit HSO<sub>3</sub>-abspaltenden Mitteln als auch mit Carboxyalkylhalogeniden derart verestert bzw. veräthert, daß ein Teil der SO<sub>3</sub>H-Gruppen — bevorzugt mehr als 30 % — durch Carboxyalkylgruppen ersetzt wird.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen

